

UNITED STATES PATENT & TRADEMARK OFFICE

Re: Application of: **Werner WITTKE et al.**
Serial No.: To Be Assigned
Filed: Herewith as national phase of International
Application No. PCT/EP2003/007054, filed 2 July 2003
For: **CARRIER DEVICE FOR A BIOLOGICAL
PREPARATION WHICH CAN BE CUT BY
MEANS OF LASER MICRO-DISSECTION**
Customer No.: 23280

LETTER RE: PRIORITY

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

January 27, 2005

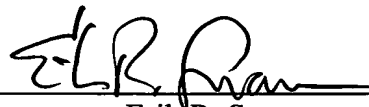
Sir:

Applicant hereby claims priority of German Application Serial No. DE 102 34 755.7, filed 30 July 2002, through International Application Serial No. PCT/EP2003/007054, filed 2 July 2003.

Respectfully submitted,

DAVIDSON, DAVIDSON & KAPPEL, LLC

By

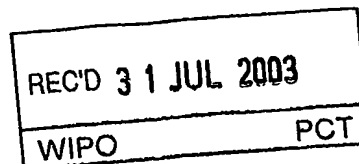


Erik R. Swanson
Reg. No. 40,833

Davidson, Davidson & Kappel, LLC
485 Seventh Avenue, 14th Floor
New York, New York 10018
(212) 736-1940

10/523350

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 34 755.7

Anmeldetag: 30. Juli 2002

Anmelder/Inhaber: Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar/DE

Bezeichnung: Trägervorrichtung für ein biologisches, mittels
Laser-Mikrodissektion schneidbares Präparat

IPC: G 01 N, C 12 M

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der
ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 16. Mai 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident

Im Auftrag

Walther

**Trägervorrichtung für ein biologisches, mittels Laser-Mikrodissektion
schneidbares Präparat**

Die Erfindung betrifft eine Trägervorrichtung für ein biologisches, mittels
Laser-Mikrodissektion schneidbares Präparat, das auf einer freigespannten
5 laserlichtabsorbierenden Folie angeordnet ist, die auf einen rahmenförmigen
Halter aufgebracht ist.

Mit Mikrodissektion wird im Bereich der Biologie und der Medizin ein
Verfahren bezeichnet, mit dem aus einem im allgemeinen flachen Präparat
(beispielsweise Zellen oder ein Gewebeschnitt) ein kleines Stück mit einem
10 feinen, fokussierten Laserstrahl ausgeschnitten wird. Das ausgeschnittene
Stück steht damit für weitere biologische oder medizinische (z.B.
histologische) Untersuchungen zur Verfügung. Die Art der Präparat-
Vorbereitung hängt unter anderem davon ab, mit welchem Verfahren zur
Laser-Mikrodissektion die Bearbeitung des Präparats vorgenommen werden
15 soll.

Aus der DE 201 00 866.1 ist eine Trägervorrichtung für ein Präparat,
insbesondere für ein biologisches Präparat, bekannt, wobei das Präparat zum
Ausschneiden eines Präparatbereichs mittels eines fokussierten Laserstrahls
vorgesehen ist. Die Trägervorrichtung weist eine laserlichtabsorbierende und
20 somit laserschneidbare Folie zur Aufnahme des Präparats auf, wobei die
Folie auf einen rahmenförmigen Halter aufgebracht ist, so dass sie freigespannt
ist, also nicht durch weitere Trägermittel unterhalb der Folie unterstützt oder
getragen wird. Diese Trägervorrichtung für ein Präparat ist speziell dazu
ausgelegt, in einem Verfahren zur Laser-Mikrodissektion angewendet zu
25 werden, in dem der schneidende, fokussierte Laserstrahl von oben auf das

Präparat gerichtet wird und der ausgeschnittene Präparatbereich nach dem Schneidvorgang herabfällt.

Ein solches Verfahren wurde bereits in dem Artikel „Cell surgery by laser micro-dissection: a preparative method“, G. Isenberg, W. Bielser, W. Meier-
5 Ruge, E. Remy, Journal of Microscopy, Vol. 107, Mai 1976, Seiten 19 – 24, beschrieben. Dabei wird ein fokussierter Laserstrahl eines gepulsten UV-Lasers von oben auf ein, vorzugsweise biologisches, Präparat gerichtet und ein interessierender Präparatbereich mit dem fokussierten Laserstrahl entlang einer geschlossenen Schnittlinie umfahren. Dadurch wird der
10 interessierende Präparatbereich vollständig aus seiner Umgebung herausgetrennt und fällt herab in eine Sammelvorrichtung.

Ein neueres Verfahren und eine Vorrichtung zur Laser-Mikrodissektion beschreibt die DE 100 43 506. Dabei wird ein fokussierter Laserstrahl von oben auf ein, vorzugsweise biologisches, Präparat gerichtet wird. In einem
15 ersten Schritt wird ein interessierender Präparatbereich mit dem fokussierten Laserstrahl entlang einer offenen, den interessierenden Präparatbereich weitgehend unschließenden Schnittlinie umfahren wird, wobei zwischen Anfang und Ende der Schnittlinie ein stabiler Steg stehen bleibt, über den der interessierende Präparatbereich mit der umgebenden Probe verbunden ist. In
20 einem zweiten Schritt wird der Steg mit einem einzigen fokussierten, auf den Steg gerichteten Laserpuls durchgeschnitten, wobei die Schnittbreite zuvor auf die Breite des Steges angepasst, d.h. vergrößert, wurde. Mit dem letzten schneidenden Laserpuls wird der interessierende Präparatbereich vollständig aus seiner Umgebung herausgetrennt und fällt herab. Das Verfahren hat
25 gegenüber dem vorher genannten Verfahren den Vorteil, dass es ein Wegklappen bzw. Verdrehen des fast ausgeschnittenen Präparatbereichs gegen Ende des Schneidvorgangs verhindert.

Die bisherigen Anwendungsgebiete der Laser-Mikrodissektion bestanden in der Selektion von Zellen aus histologischen Schnitten, z.B. in der molekularen
30 Pathologie, der Zellbiologie und der Neuroforschung. Zunehmend besteht jedoch bei den Anwendern der Wunsch, auch eine Selektion von Zellen aus

einer Kultur oder Ansammlung von lebenden Zellen vorzunehmen. Für die Zellkultur müssen daher die oben genannten Trägervorrichtungen in eine Petrischale gelegt werden. Anschließend werden die Folien der Trägervorrichtungen mit Kulturmedium benetzt bzw. beschichtet und die gewünschten Zellen darauf ausgesät. Nach Anwachsen der Zellen werden die Trägervorrichtungen aus der Petrischale entnommen und in eine Vorrichtung zur Laser-Mikrodissektion, wie in der DE 100 43 506 beschrieben, eingelegt.

Dies Verfahren hat den Nachteil, dass die Zellen nach der Entnahme der Trägervorrichtung aus der Petrischale nur noch kurze Zeit am Leben gehalten werden können. Außerdem kann die Folie der Trägervorrichtungen bei der Handhabung beschädigt werden. Weiterhin kann es zu Kontaminationen an der Vorrichtung zur Laser-Mikrodissektion kommen, da die Trägervorrichtung auch im Bereich ihres Rahmens bzw. ihrer Unterseite mit Kulturmedium in Kontakt kommt, so dass es dort ebenfalls zu einer Besiedlung mit Zellen kommen kann. Bei der Untersuchung von Krankheitserregern ergibt sich daher nicht nur ein Handhabungsproblem, sondern auch ein hygienisches Problem.

Es ist daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine Trägervorrichtung anzugeben, welche in komfortabler und hygienischer Weise eine Laser-Mikrodissektion an lebenden Zellkulturen insbesondere mit einem von oben auf das Präparat gerichteten Laserstrahl erlaubt.

Diese Aufgabe wird gelöst durch eine Trägervorrichtung für ein biologisches, mittels Laser-Mikrodissektion schneidbares Präparat, das auf einer freigespannten laserlichtabsorbierenden Folie angeordnet ist, welche auf einen rahmenförmigen Halter aufgebracht ist, wobei sich die Trägervorrichtung erfindungsgemäß dadurch auszeichnet, dass der rahmenförmige Halter im wesentlichen als Wand einer Petrischale mit ganz oder teilweise fehlendem Boden ausgebildet ist und dass anstelle des fehlenden Bodens ausschließlich die laserlichtabsorbierende Folie angeordnet ist.

Die erfindungsgemäße Trägervorrichtung hat den Vorteil, dass die Trägervorrichtung selbst zur Vorkultur der Zellen verwendet wird, wodurch die Zellvorkultivierung vereinfacht ist. Nach der Anzucht befinden sich die Zellen auch während der Laser-Mikrodissektion unter optimierten, zuverlässigen Wachstumsbedingungen. Das Handhabungsproblem entfällt, da eine Entnahme der Zellkulturen aus der Petrischale, wie bisher, nicht mehr erforderlich ist. Ebenso ist eine Kontamination der benutzten Vorrichtung zur Laser-Mikrodissektion ausgeschlossen.

Es sind verschiedene Ausgestaltungen der Trägervorrichtung möglich. So kann beispielsweise der gesamte Boden der Petrischale durch die laserlichtabsorbierende Folie gebildet werden. Es ist aber auch denkbar, nur einen Teil des Bodens der Petrischale durch die laserlichtabsorbierende Folie zu bilden. So kann beispielsweise die Wand der Petrischale sowie noch ein Randbereich des Bodens aus Kunststoff ausgebildet sein und nur eine verbleibende Öffnung des Bodens der Petrischale wird durch die Folie geschlossen. Entscheidend ist, dass die Folie zum einen laserlichtabsorbierend, also laserschneidbar, ist als auch, dass die Folie stabil genug ist, um in der überspannten Bodenöffnung nicht durchzuhängen und das Kulturmedium samt Zellen zu tragen. Die Schichtdicke der Folie muss daher ausreichend dick gewählt werden.

Bewährt hat sich daher für die laserlichtabsorbierende Folie der Trägervorrichtung eine Polyethylen-Naphtalat-Folie (PEN), die vorzugsweise eine Dicke von 1,35 μm oder 2,5 μm aufweist. Je nach Anwendung können aber auch andere Foliendicken zum Einsatz kommen.

Die Verbindung zwischen der Wand der Petrischale und der laserlichtabsorbierenden Folie kann auf unterschiedliche Weise realisiert werden. So kann beispielsweise die laserlichtabsorbierende Folie mit dem unteren Rand der Wand der Petrischale bzw. dem Randbereich der Öffnung im Boden der Petrischale verschweißt sein.

Ein preiswerte Lösung besteht darin, dass die Wand der Petrischale mit der laserlichtabsorbierenden Folie verklebt ist. Dazu kann die Verklebung mittels eines Klebebandes vorgenommen werden. Das Klebeband wird dazu vorzugsweise in Form einer Schablone so ausgestaltet ist, dass das

5 Klebeband auf seiner einen Seite mit der Wand der Petrischale und auf seiner anderen Seite mit der laserlichtabsorbierende Folie verklebt ist.

In einer anderen Ausgestaltung der Verbindung zwischen der Wand der Petrischale und der laserlichtabsorbierenden Folie kann die Folie auf ringförmigen Halteelementen bereits vorpräpariert, also mittels Schweiß- oder Klebetechnik aufgebracht sein. Der Durchmesser der ringförmigen Halteelemente ist auf die zylindrisch ausgebildete Wand der Petrischale abgestimmt. Die ringförmigen Halteelemente weisen Rastnuten auf, welche ein Einrasten der Wand der Petrischale erlauben, so dass eine flüssigkeitsdichte, wiederlösbare Verbindung zwischen der Wand der

10 Petrischale und dem ringförmigen Halteelement mit dem laserschneidbaren Folienboden entsteht. Diese Ausführungsform hat den Vorteil, dass das ringförmige Halteelement mit dem laserschneidbaren Folienboden wieder von der Wand der Petrischale getrennt werden kann, so dass die Zellkultur entweder weiterbearbeitet werden kann oder beispielsweise platzsparend

15 archiviert bzw. eingefroren werden kann.

20

Für die Handhabung im Labor erweist es sich als vorteilhaft, wenn die laserlichtabsorbierende Folie hydrophil ausgestaltet ist, da dies das Aufbringen eines Zellkulturmediums auf die laserschneidbare Folie erleichtert. Üblicherweise wird als Nährmedium eine Nährflüssigkeit verwendet.

25 Nährmedien für die Zellkultur sind im Handel erhältlich, beispielsweise DMEM (Dulbeco's Modified Eagle's Medium) oder RPMI (Rosewell Park Memorial Institute Medium) oder MEM.

Je nach Größe der ausgeschnittenen Präparatbereiche kann die Nährflüssigkeit durch die mikroskopisch kleinen Löcher, die bei der Laser-

30 Mikrodissektion in der laserschneidbaren Folie entstanden sind,

hindurchsickern. Daher erweist es sich als besonders vorteilhaft, wenn das Nährmedium als ein Nähr-Gel ausgebildet ist, das ausreichend fest oder zumindest sehr viskos ist, so dass es um die durch Mikrodisektion erzeugten Löcher in der laserschneidbaren Folie „stehen bleibt“.

- 5 Das Heraustrennendes gewünschten Präparatbereiches kann erfolgen, indem der interessierende Präparatbereich mit dem fokussierten Laserstrahl entlang einer geschlossenen Schnittlinie umfahren wird. Nachdem der interessierende Präparatbereich mittels des Laserstrahls vollständig aus seiner Umgebung herausgetrennt ist, fällt er herab und kann in einer Auffangvorrichtung
10 gesammelt werden.

- In einem alternativen Schneidverfahren wird ein interessierender Präparatbereich mit dem fokussierten Laserstrahl entlang einer offenen, den interessierenden Präparatbereich weitgehend unschließenden Schnittlinie umfahren wird. Dabei bleibt zwischen Anfang und Ende der Schnittlinie ein
15 stabiler Steg stehen, über den der interessierende Präparatbereich mit der umgebenden Probe verbunden ist. In einem zweiten Schritt wird der Steg mit einem einzigen fokussierten, auf den Steg gerichteten Laserpuls, dessen Schnittbreite auf den Steg angepasst ist, durchgeschnitten. Dadurch wird der interessierende Präparatbereich vollständig aus seiner Umgebung
20 herausgetrennt und fällt herab.

- Die erfindungsgemäße Trägervorrichtung erlaubt die Verwendung eines Verfahrens zur Laser-Mikrodisektion an biologischen Lebend-Zellkulturen, bei dem ein fokussierter Laserstrahl von oben auf ein biologisches Lebend-Präparat gerichtet wird. Dabei werden die Zellen besonders schonend
25 behandelt, da sie nach dem Ausschneiden durch Schwerkraft in ein Sammelgefäß fallen. Ein mechanischer oder laser-induzierter Transport der Zellen, der die Gefahr der Zellschädigung in sich birgt, wird dadurch überflüssig.

Anwendungsbereiche sind die Selektion von vorzugsweise lebenden Zellen oder Organismen aus Reinkulturen oder Mischkulturen, um sie einer weiteren Analyse oder Kultivierung zuzuführen. So kann beispielsweise eine Separierung von Krebszellen aus einem Verband gesunder Zellen, von
5 gefärbten Zellen aus Kulturen, von Mikro-Organismen aus Mischkulturen (bzw. Kulturen) oder von Parasiten aus Kulturen vorgenommen werden.

Vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung werden nachfolgend anhand der schematischen Zeichnung erläutert. Es zeigen:

10 **Fig. 1:** eine erste Ausgestaltung einer Trägervorrichtung mit vollflächigem Folienboden;

Fig. 2: eine zweite Ausgestaltung einer Trägervorrichtung mit nicht vollflächigem Folienboden;

Fig. 3: eine dritte Ausgestaltung einer Trägervorrichtung mit reversibel anfügbarem vollflächigem Folienboden;

15 **Fig. 4:** eine Vorrichtung zur Laser-Mikrodissektion mit einer Trägervorrichtung mit vollflächigem Folienboden;

20 **Fig. 1** zeigt eine erste Ausgestaltung einer Trägervorrichtung 1 mit vollflächigem Folienboden. Dabei zeigt **Fig. 1a** die Trägervorrichtung 1 in einem senkrechten Schnitt. **Fig. 1b** zeigt die Trägervorrichtung 1 von unten.

Die Trägervorrichtung 1 weist einen rahmenförmigen Halter auf, der als Wand 2 einer Petrischale ausgebildet ist, die typischerweise aus Kunststoff besteht. Die Petrischale weist keinen Boden auf. Der fehlende Boden der Petrischale ist ersetzt durch eine laserlichtabsorbierende und damit laserschneidbare
25 Folie 3, die an dem unteren Rand 4 der Wand 2 angeklebt ist. Der Kleber ist nur in dünner Schicht aufgetragen und daher nicht dargestellt. Entscheidend ist, dass die Klebe-Verbindung beständig gegen eine später aufzubringende Nährlösung oder ein viskoses Nährgel für die anzuziehende Zellkultur ist.

Darüber hinaus muss sichergestellt sein, dass der Kleber nicht zytotoxisch ist, damit das biologische Präparat nicht geschädigt wird.

Die Absorption der laserschneidbaren Folie 3 ist an die Wellenlänge des zum Schneiden vorgesehenen Lasers angepasst, wobei vorzugsweise ein
5 gepulster UV-Laser zur Laser-Mikrodissektion verwendet wird. Bewährt hat sich daher für die laserlichtabsorbierende Folie 3 der Trägervorrichtung 1 die Verwendung einer Polyethylen-Naphtalat-Folie (PEN), die vorzugsweise eine Dicke von 1,35 μm oder 2,5 μm aufweist. Je nach Anwendung können aber auch andere Foliendicken zum Einsatz kommen.

10 Um später ein problemloses Schneiden mit dem fokussierten Laserstrahl zu ermöglichen, muss die Folie exakt eben und ohne Wellenbildung aufgebracht sein. Nur dann ist es möglich, nach einer einmal vorgenommenen Justierung des Fokus des Laserstrahls durch einfache Relativbewegung des Laserstrahls und der Trägervorrichtung zueinander an verschiedenen Stellen der Folie
15 schneiden zu können, so dass eine geschlossen Schnittlinie entstehen kann.

Ein biologisches Präparat 5 ist auf die laserschneidbare Folie 3 aufgebracht. In vorliegenden Beispiel handelt es sich um ein biologisches Lebend-Präparat. Dies wurde gewonnen, indem die laserschneidbare Folie 3 der
Trägervorrichtung 1 mit Kulturmedium benetzt bzw. beschichtet wurde. Darauf
20 wurden die gewünschten Zellen ausgesät. Entscheidend ist hierbei, dass die Dicke der laserschneidbaren Folie 3 ausreichend ist, um das Präparat und das Kulturmedium zu tragen, ohne sich durchzubiegen. Nur dann ist später, wie oben beschrieben, ein präzises Schneiden der ebenen Folie 3 in einer
einzigsten Fokuseinstellung des Laserstrahls möglich. Durch das Anwachsen
25 der Zellkultur entstand das Präparat 5. Nunmehr kann die Trägervorrichtung 1 mitsamt dem Präparat 5, also der Zellkultur, in eine Vorrichtung zur Laser-Mikrodissektion eingelegt werden.

30 **Fig. 2** zeigt eine zweite Ausgestaltung einer Trägervorrichtung 1 mit nicht vollflächigem Folienboden. Dabei zeigt **Fig. 2a** die Trägervorrichtung 1 in

einem senkrechten Schnitt. Die Trägervorrichtung 1 weist einen rahmenförmigen Halter auf, der als Wand 2 einer Petrischale ausgebildet ist und noch einen äußeren ringförmigen Teil 6 des Bodens der Petrischale bildet.

5 **Fig. 2b** zeigt die Trägervorrichtung 1 von unten. In dieser Darstellung ist deutlich sichtbar, dass die Petrischale keinen geschlossenen Boden aufweist. Statt dessen ist nur ein äußerer ringförmiger Teil 6 des Bodens der Petrischale vorhanden, der eine freie Öffnung 7 umschließt. Die Öffnung 7 ist
10 überspannt und damit geschlossen durch eine laserschneidbare Folie 3, die an der Unterseite des ringförmigen Teils 6 des Bodens der Petrischale angeklebt ist. Auf diese Weise ersetzt die laserschneidbare Folie 3 den fehlenden Boden der Petrischale. Im vorliegenden Beispiel wurde die Klebung mittels einer passend geformten Klebefolie 8 realisiert.

15 **Fig. 2c** zeigt in Aufsicht eine Ausführungsform dieser passend geformten Klebefolie 8. Sie ist schablonenförmig so vorgeformt, dass es die freie Öffnung 7 vollständig umschließt. Eine kleine Lasche 9 erleichtert die Handhabung.

Bei der Klebefolie 8 kann es sich vorzugsweise um ein doppelseitig klebendes Klebeband handeln, bei dem auf einem festen, nicht lösbaren Trägermaterial
20 beidseitig Klebstoff aufgebracht, der jeweils außenseitig mit einer Deckfolie abgedeckt ist. Nach Abziehen der ersten Deckfolie kann das Klebeband mit dem freigelegten Klebstoff auf die gewünschte Stelle an der Unterseite des ringförmigen Teils 6 des Bodens der Petrischale platziert werden. Anschließend wird auch die zweite Deckfolie abgezogen, so dass das
25 Klebeband mit seinem Trägermaterial am ringförmigen Teil 6 des Bodens verbleibt. Dann kann die laserschneidbare Folie 3 auf den frei liegenden Klebstoff des Klebebands aufgebracht und mit diesem verklebt werden.

Alternativ kann als Klebefolie 8 auch ein fester Klebstofffilm verwendet werden, der zwischen zwei stabilen Deckfolien aufgebracht ist. Nach
30 Abziehen der ersten Deckfolie kann der Klebstofffilm auf die gewünschte Stelle an der Unterseite des ringförmigen Teils 6 des Bodens der Petrischale

platziert werden. Anschließend wird auch die zweite Deckfolie abgezogen, so dass ausschließlich der Klebstofffilm am ringförmigen Teil 6 des Bodens verbleibt. Dann kann die laserschneidbare Folie 3 auf den Klebstofffilm aufgebracht und mit diesem verklebt werden.

- 5 Entscheidend ist bei allen Klebungen stets, dass die Klebung beständig gegen eine später aufzubringende Nährlösung oder ein viskoses Nährgel für die anzuziehende Zellkultur ist. Außerdem muss die Klebeverbindung dem Gewicht von Folie 3, Nährmedium und Zellkultur standhalten. Darüber hinaus muss sichergestellt sein, dass die Klebefolie nicht zytotoxisch ist, damit das
- 10 biologische Präparat nicht geschädigt wird.

- Fig. 3** zeigt eine weitere Ausgestaltung einer Trägervorrichtung 1 mit einem reversibel anfügbarem vollflächigem Folienboden. Dabei zeigt **Fig. 3a** die Trägervorrichtung 1 in einem senkrechten Schnitt. Die Trägervorrichtung weist
- 15 einen rahmenförmigen Halter auf, der als Wand 2 einer Petrischale ausgebildet ist. Die Petrischale weist keinen Boden auf. Der fehlende Boden der Petrischale ist ersetzt durch eine laserlichtabsorbierende und damit laserschneidbare Folie 3.

- Die laserschneidbare Folie 3 ist im Gegensatz zu dem Ausführungsbeispiel aus **Fig. 1** jedoch nicht direkt an dem unteren Rand der Wand 2 angeklebt. Statt dessen weist die Trägervorrichtung zusätzlich ein ringförmiges Halteelement 10 auf, an dessen Unterseite die laserschneidbare Folie 3 aufgeklebt ist. An seiner Oberseite weist das ringförmige Halteelement 10 eine
- 20 umlaufende Rastnut 11 auf, in welche die untere Kante der Wand 2 der Petrischale eingerastet ist. Dazu sind der Durchmesser des ringförmigen Halteelementes 10 und der Rastnut 11 auf die zylindrisch ausgebildete Wand der Petrischale angepasst.
- 25

Fig. 3b zeigt die Trägervorrichtung 1 von unten. Sichtbar ist das ringförmige Halteelement 10, an dessen Unterseite die laserschneidbare Folie 3

aufgeklebt ist. Die Klebung kann nach einer der Methoden vorgenommen werden, die zu **Fig. 1** und **Fig. 2** beschrieben wurden.

Fig. 3c zeigt das ringförmige Halteelement 10 in der Aufsicht mit der auf der Oberseite umlaufenden Rastnut 11. Die Rastverbindung ist flüssigkeitsdicht, so dass die laserschneidbare Folie 3 mit flüssigem Nährmedium bedeckt werden kann, ohne dass Flüssigkeit durch die Rastverbindung hindurchtritt. Zugleich wird durch die Rastverbindung eine wiederlösbare Verbindung zwischen der Wand 2 der Petrischale und dem ringförmigen Halteelement 10 mit der laserschneidbaren Folie 3 gebildet. Diese Ausführungsform hat den Vorteil, dass bei Bedarf das ringförmige Halteelement 10 mit der laserschneidbaren Folie 3 wieder von der Wand 2 der Petrischale getrennt werden kann.

In **Fig. 4** ist eine Vorrichtung zur Laser-Mikrodissektion mit einer erfindungsgemäßen Trägervorrichtung 1 dargestellt. Mit der Vorrichtung zur Laser-Mikrodissektion wird beim Schneiden ein Laserstrahl über einer relativ dazu festgehaltenes Präparat bewegt. Die Vorrichtung zur Laser-Mikrodissektion umfasst ein Mikroskop 12 mit einem Mikroskopstativ 18 und einem motorisch verfahrbaren xy-Tisch 13 auf. Der xy-Tisch 13 dient der Aufnahme der Trägervorrichtung 1.

Die Trägervorrichtung 1 weist einen rahmenförmigen Halter auf, der als Wand 2 einer Petrischale ausgebildet ist, die typischerweise aus Kunststoff besteht. Die Petrischale weist keinen Boden auf. Der fehlende Boden der Petrischale ist ersetzt durch eine laserlichtabsorbierende und damit laserschneidbare Folie 3, die an dem unteren Rand 4 der Wand 2 angeklebt ist. Der Kleber ist nur in dünner Schicht aufgetragen und daher nicht dargestellt. Auf der laserlichtabsorbierenden und damit laserschneidbaren Folie 3 ist eine biologische Lebend-Präparat 5 aufgebracht bzw. bereits angezchtet. Um das Präparat 5 von unten beleuchten zu können, weist der xy-Tisch 13 eine rahmenförmige Tischöffnung 15 auf.

Bei dem dargestellten Mikroskop 12 handelt es sich um ein Durchlicht-Mikroskop. Dazu ist unter dem xy-Tisch 13, und damit auch unterhalb des Präparats 5, ein Beleuchtungssystem 15 und ein Kondensor 21 angeordnet, der die Probe 4 beleuchtet. Unterhalb des Präparats 5 ist mindestens ein
5 Auffangbehältnis 29 zum Auffangen des ausgeschnittenen, interessierenden Präparatbereichs angeordnet. Das die Präparat 5 durchdringende Licht gelangt zum Objektiv 19 des Mikroskops 12. Innerhalb des Mikroskops 12 wird das Licht über nicht dargestellte Linsen und Spiegel mindestens einem Okular 22 zugeleitet, durch welches ein Bediener das auf dem xy-Tisch 13
10 angeordnete Präparat 5 betrachten kann.

Von einem Laser 16, in diesem Beispiel ein UV-Laser, geht ein Laserstrahl 17 aus, der in einen Auflicht-Beleuchtungsstrahlengang mit einer optischen Achse 20 eingekoppelt wird. In dem Beleuchtungsstrahlengang ist eine Laser-Scan-Einrichtung 30 angeordnet. Der Laserstrahl 17 durchläuft die Laser-
15 Scan-Einrichtung 30 und gelangt über ein optisches System 23 zu einem Objektiv 19, das den Laserstrahl 17 auf das Präparat 5 fokussiert. Das optische System 23 ist vorzugsweise als dichromatischer Teiler ausgeführt, durch den ein von dem Präparat 5 durch das Objektiv 19 ausgehender Abbildungsstrahlengang zu mindestens einem Okular 22 gelangt. Alternativ
20 kann das optische System 23 aus mehreren optischen Bauteilen bestehen. Dies ist beispielsweise dann der Fall, wenn der Laserstrahl 17 mehrfach umgelenkt werden muss.

Ferner ist im Laserstrahl 17 eine Blende 24 vorgesehen, mit welcher der Durchmesser des Laserstrahls 17 einstellbar ist. Die Blende 24 kann z.B. als
25 eine Festblende ausgebildet sein. In einer vorteilhaften Ausführungsform können mehrere Festblenden auf einer Revolverscheibe oder einem Linearschieber angeordnet sein, um eine dieser Festblenden als die jeweils erforderliche Blende 24 in den Strahlengang einzubringen. Das Einbringen in den Laserstrahl 17 wird manuell durch den Benutzer oder motorisch
30 durchgeführt.

Die Einstellung der Laser-Scan-Einrichtung 30 und damit die Verstellung des Laserstrahls 17 auf das Präparat 5 erfolgt in dieser Ausführungsform mit einem der Laser-Scan-Einrichtung 30 zugeordneten Motor 31, einer Steuerungseinheit 32 und einem Rechner 26. Der Motor 31 ist mit der

5 Steuerungseinheit 32 verbundenen, welche die Steuersignale zur Ansteuerung des Motors 31 liefert. Die Steuerungseinheit 32 ist mit dem Rechner 26 verbunden, an den ein Monitor 28 angeschlossen ist. Auf dem Monitor 28 wird das von einer Kamera 27 aufgenommene Bild des Präparats 5 dargestellt. Das System aus Rechner 26, Kamera 27 und Monitor 28 dient

10 dazu, den Schneidevorgang zu beobachten und zu überwachen. So kann der Rechner an den Laser Triggersignale zur Auslösung von Laserimpulsen und zur Steuerung der Laserleistung abgeben, den Blenden-Motor 25 ansteuern und eine (nicht dargestellte) Autofokuseinrichtung für den Laser 16 ansteuern. Dazu ist der Rechner 26 mit dem Laser 16 verbunden und liefert diesem

15 Triggersignale zum Auslösen von Laserimpulsen, wenn ein Schneidevorgang durchgeführt wird.

Mittels einer Rechner-Maus (nicht dargestellt) oder einer anderen beliebigen Cursorsteuerung-Einrichtung wird auf dem Monitor 28 der auszuschneidende, interessierende Probenbereich des Präparats 5 mittels eines Mauszeigers

20 umfahren. Auf diese Weise wird auf dem Monitor 28 in dem Kamerabild eine gewünschte Soll-Schnittlinie definiert.

Die Laser-Scan-Einrichtung 30 selbst dient als Schnittlinien-Steuerungseinheit, die während des Schneidvorgangs den auf das biologische Präparat 5 fokussierten Laserstrahl 17 über das feststehende Präparat 5

25 bewegt. Dazu wird während des Schneidvorgangs der xy-Tisch 13 horizontal, also in x-Richtung und in y-Richtung, nicht verfahren.

Die Fokussierung des Laserstrahls 17 auf das biologische Präparat 5 kann durch manuelle Höheneinstellung des xy-Tisches 13 bei gleichzeitiger visueller Kontrolle des Kamerabildes durch einen Benutzer erfolgen.

30 Bedienungsfreundlicher ist jedoch eine Ausführungsform der Vorrichtung, die eine Autofokus-Vorrichtung (nicht dargestellt) für den Laserstrahl 17 umfasst.

Durch Ansteuerung der Laser-Scan-Einrichtung 30 kann der Laserstrahl 17 auf beliebige Positionen auf dem Präparat 5 geführt werden. Während der gesamten Vorbereitung des Schnitts und auch während des Schnitts selbst kann das biologische Präparat 5 lebend erhalten werden, da die

5 Wachstumsbedingungen in der Trägervorrichtung 1 stets erhalten bleiben.

Durch geeignete Ansteuerung der Laser-Scan-Einrichtung 30 wird der fokussierte Laserstrahl 17 über das Präparat 5 bewegt und dadurch eine geschlossene Schnittlinie um den interessierenden Präparatbereich erzeugt. Der interessierende Präparatbereich selbst wird zu keinem Zeitpunkt mit der

10 Laserstrahlung bestrahlt, so dass eine schädigende Wirkung der Laserstrahlung auf den interessierenden Präparatbereich ausgeschlossen ist. Nach dem Schließen der Schnittlinie ist der interessierende Präparatbereich von dem umgebenden restlichen Präparat 5 vollständig getrennt und fällt unter Einwirkung der Schwerkraft in das darunter angeordnete Auffangbehältnis 29.

15

Bezugszeichenliste

	1. Trägervorrichtung		18. Mikroskopstativ
	2. Wand der Petrischale	20	19. Objektiv
	3. laserschneidbare Folie		20. optische Achse
5	4. unterer Rand der Wand 2		21. Kondensor
	5. biologisches Präparat		22. Okular
	6. ringförmiger Teil		23. optisches System
	7. Öffnung	25	24. Blende
	8. Klebefolie		25. Blenden-Motor
10	9. Lasche		26. Rechner
	10. ringförmiges Halteelement		27. Kamera
	11. Rastnut		28. Monitor
	12. Mikroskop	30	29. Auffangbehältnis
	13. verfahrbarer xy-Tisch		30. Laser-Scan-Einrichtung
15	14. rahmenförmige Tischöffnung		31. Motor für Laser-Scan- Einrichtung
	15. Beleuchtungssystem		32. Steuerungseinheit
	16. Laser		
	17. Laserstrahl		
35			

Patentansprüche

- 5 1) Trägervorrichtung (1) für ein biologisches, mittels Laser-
Mikrodissektion schneidbares Präparat (5), das auf einer
freigespannten laserlichtabsorbierenden Folie (3) angeordnet ist, die
auf einen rahmenförmigen Halter aufgebracht ist
dadurch gekennzeichnet,
dass der rahmenförmige Halter im wesentlichen als Wand (2) einer
Petrischale mit ganz oder teilweise fehlendem Boden ausgebildet ist
und dass anstelle des fehlenden Bodens ausschließlich die
10 laserlichtabsorbierende Folie (3) angeordnet ist.
- 2) Trägervorrichtung (1) nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet,**
dass der gesamte Boden der Petrischale durch die
laserlichtabsorbierende Folie (3) gebildet wird.
- 15 3) Trägervorrichtung (1) nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet,**
dass die laserlichtabsorbierende Folie (3) eine Polyethylen-Naphtalat-
Folie (PEN) ist.
- 4) Trägervorrichtung (1) nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet,**
dass die Polyethylen-Naphtalat-Folie eine Dicke von 1,35 µm oder 2,5
µm aufweist.
- 20 5) Trägervorrichtung (1) nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet,**
dass die laserlichtabsorbierende Folie (3) mit der Wand (2) der
Petrischale verschweißt ist.

- 6) Trägervorrichtung (1) nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**,
dass die Wand (2) der Petrischale mit der laserlichtabsorbierende Folie
(3) verklebt ist.
- 5 7) Trägervorrichtung (1) nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**,
dass die Verklebung mittels einer in Form einer Schablone
ausgebildeten Klebefolie (8) so ausgestaltet ist, dass die Klebefolie (8)
auf ihrer einen Seite mit der zylindrischen Wand (2) und auf ihrer
anderen Seite mit der laserlichtabsorbierende Folie (3) verklebt ist.
- 10 8) Trägervorrichtung (1) nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**,
dass die Wand (2) der Petrischale zylindrisch ausgebildet ist und dass
die Folie (3) mittels Schweiß- oder Klebetechnik auf einem
ringförmigen Halteelement (10) vorpräpariert ist, dessen Durchmesser
an die zylindrisch ausgebildete Wand (2) der Petrischale angepasst ist
und das eine Rastnut (11) aufweist, welche ein Einrasten der Wand (2)
15 der Petrischale in das ringförmige Halteelement (10) erlaubt, so dass
eine flüssigkeitsdichte, wiederlösbare Verbindung zwischen der Wand
(2) der Petrischale und dem ringförmigen Halteelement (10) mit der
laserlichtabsorbierende Folie (3) entsteht.
- 20 9) Trägervorrichtung (1) nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass die laserlichtabsorbierende Folie (3)
hydrophil ausgestaltet ist.
- 25 10) Trägervorrichtung (1) nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass die laserlichtabsorbierende Folie (3) ein Nährmedium zur
Zellkultur trägt.
- 11) Trägervorrichtung (1) nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**,
dass das Nährmedium als eine Nährflüssigkeit ausgebildet ist.

12) Trägervorrichtung (1) nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**,
dass das Nährmedium als ein Nähr-Gel ausgebildet ist.

5 13) Verwendung einer Vorrichtung zur Laser-Mikrodissektion, in der ein
schneidender, fokussierter Laserstrahl (17) durch ein Objektiv (19) von
oben auf ein biologisches Präparat (5) gerichtet wird, wobei ein
interessierender Präparatbereich mit einer geschlossenen Schnittlinie
umfahren und aus seiner Umgebung herausgetrennt wird, zur
Mikrodissektion an biologischen Lebend-Kulturen,
dadurch gekennzeichnet,
10 dass als Präparat (5) eine biologische Lebend-Zellkultur auf einer
laserlichtabsorbierenden Folie (3) angeordnet ist, die auf einen
rahmenförmigen Halter aufgebracht ist, wobei der rahmenförmige
Halter im wesentlichen als Wand (2) einer Petrischale ausgebildet ist
und die laserlichtabsorbierende Folie (3) als Boden der Petrischale
15 ausgebildet ist.

Zusammenfassung

Es wird eine Trägervorrichtung (1) für ein biologisches, mittels Laser-Mikrodissektion schneidbares Präparat (5) angegeben, wobei das Präparat (5) auf einer freigespannten laserlichtabsorbierenden Folie (3) angeordnet ist, die auf einen rahmenförmigen Halter aufgebracht ist. Erfindungsgemäß ist der rahmenförmige Halter im wesentlichen als Wand (2) einer Petrischale mit ganz oder teilweise fehlendem Boden ausgebildet und anstelle des fehlenden Bodens ist ausschließlich die laserlichtabsorbierende Folie (3) angeordnet ist. Eine Vorrichtung zur Laser-Mikrodissektion, in der ein schneidender, fokussierter Laserstrahl (17) durch ein Objektiv (19) von oben auf ein biologisches Präparat (5) gerichtet wird, wobei ein interessierender Präparatbereich mit einer geschlossenen Schnittlinie umfahren und aus seiner Umgebung herausgetrennt wird, eignet sich zur Laser-Mikrodissektion an biologischen Lebend-Kulturen, indem sie mit einer solchen Trägervorrichtung (1) mit einem aufgebrauchten biologischen Lebend-Präparat (5) ausgestattet wird.

(Fig. 3)

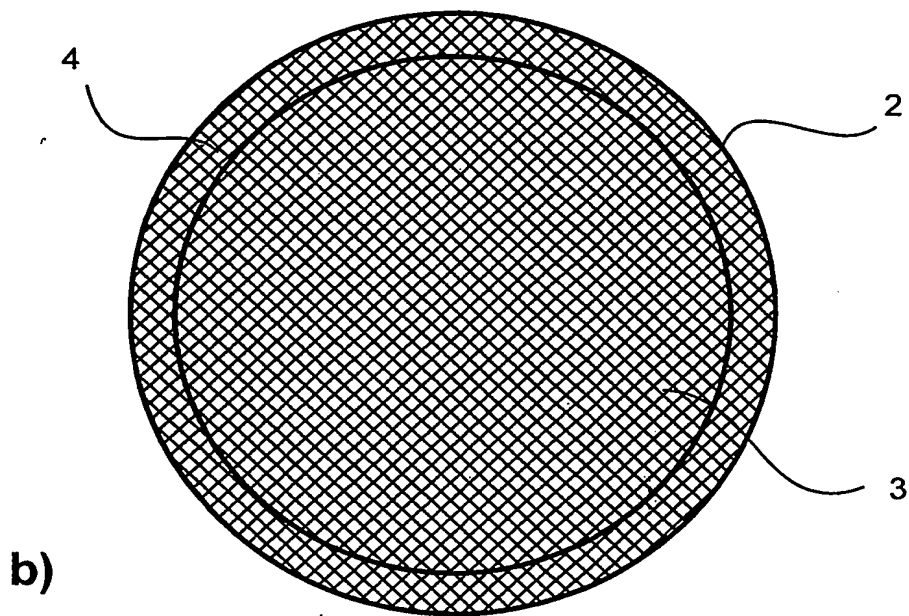
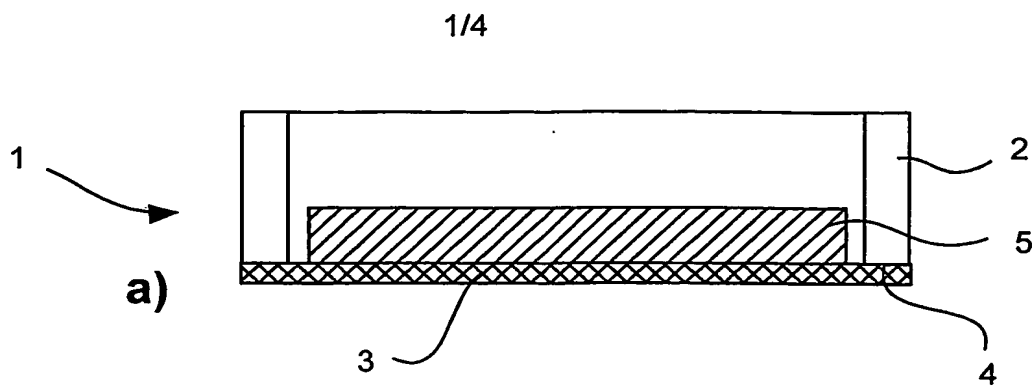


Fig. 1

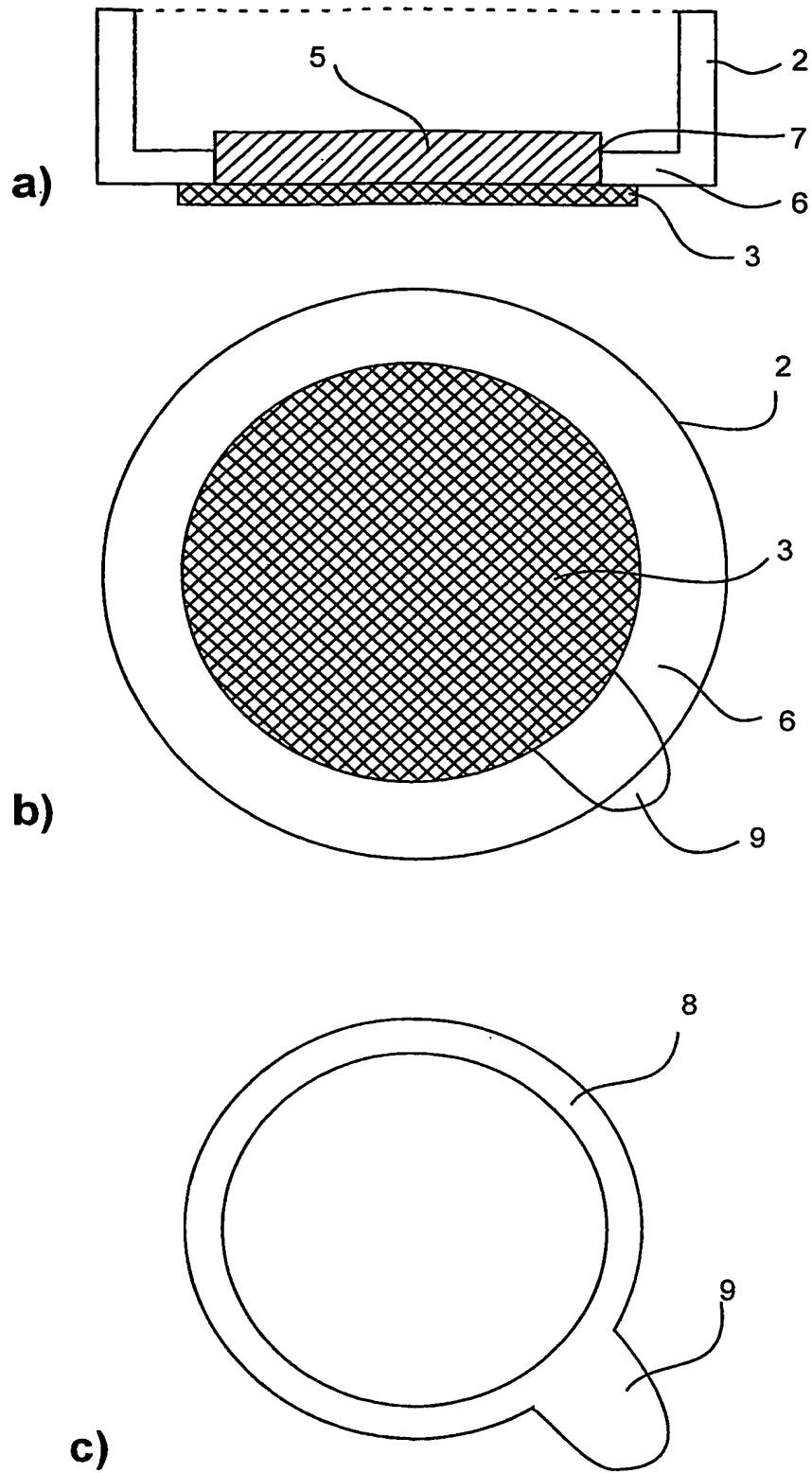


Fig. 2

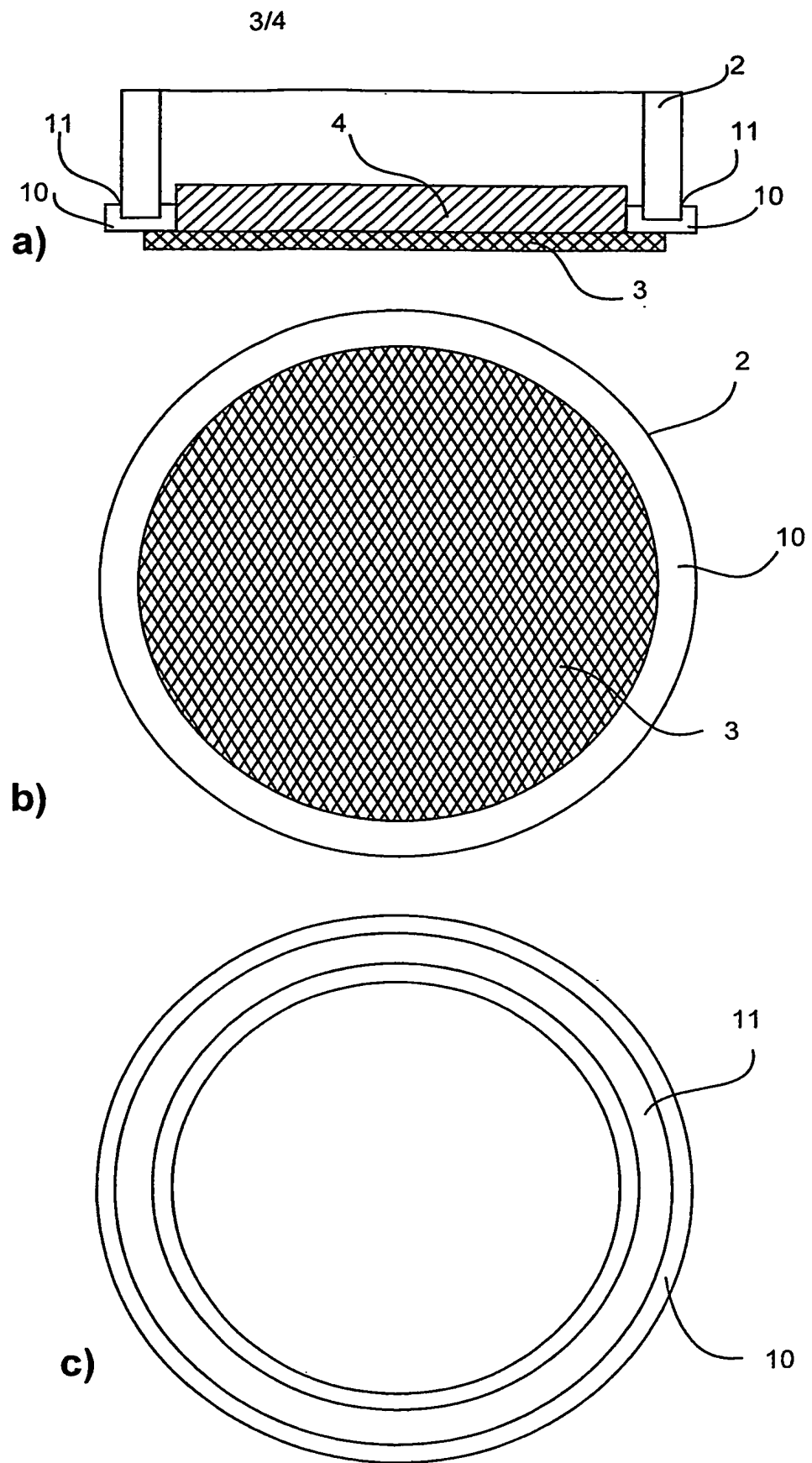
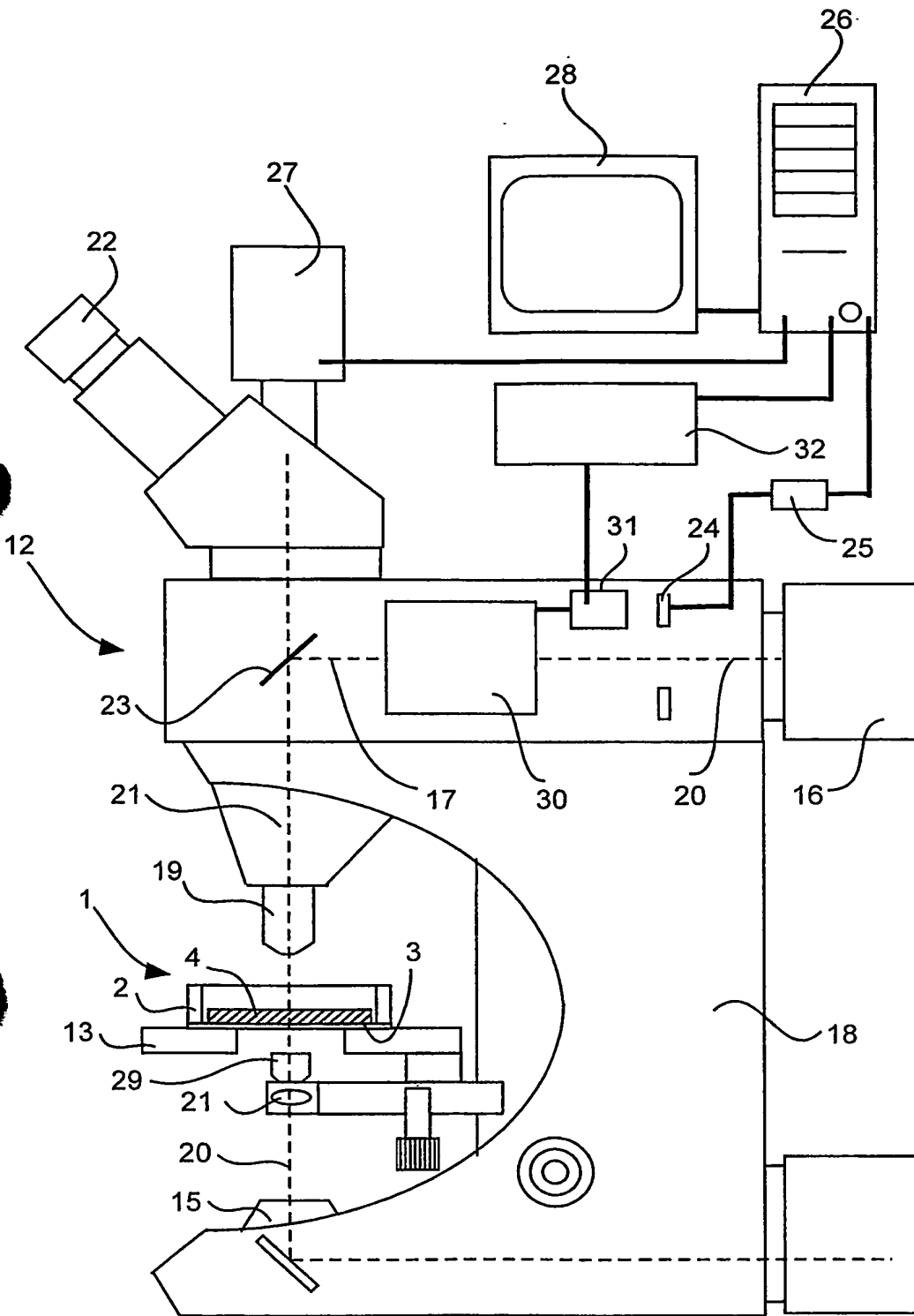


Fig. 3

**Fig. 4**